

LEUCOSIS ENZOÓTICA BOVINA: EVALUACIÓN DE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO (ID, ELISA-I, WB, PCR) EN BOVINOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE

ET González¹, GA Oliva¹, A Valera², E Bonzo³, M Licursi⁴, ME Etcheverrigaray¹

¹Cátedra de Virología, ²Centro de Diagnóstico Veterinario (CEDIVE), ³Cátedra de Epidemiología y Salud Pública, ⁴Becaria de Iniciación de la UNLP.

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

RESUMEN: Se diseñaron dos experiencias utilizando un total de 12 bovinos (8 inoculados y 4 controles) de 2 años de edad. La transmisión de la infección con virus de la Leucosis Bovina (VLB) se llevó a cabo a partir de 5, 10 o 50 µl de sangre total periférica de bovinos seropositivos asintomáticos, utilizando distintas vías: intradérmica, subcutánea, intramuscular o endovenosa. Se realizó el seguimiento semanal en ambas experiencias, durante 4 meses cada una, obteniendo los siguientes resultados. ELISA indirecto (ELISA-I): la detección de anticuerpos se comprobó en todos los animales entre la 3^o y 6^o semana posinfección (PI). Inmunodifusión en agar (ID): todos los animales inoculados dieron positivos entre la 4^o y 6^o semana, manteniéndose débiles positivos el 40 % de los animales hasta la 6^o semana PI. Western Blot (WB): los sueros positivos mostraron reactividad para la gp51 y la p24. Otras proteínas (gp30, p15, p12 y p10) no fueron detectadas en ningún caso. En el 90 % de los bovinos inoculados, los anticuerpos contra la p24 se detectaron antes (2^o-4^o semana PI) que los anticuerpos contra la gp51. PCR: Una nested PCR fue desarrollada con primers para un segmento conservado del gen env. El 75 % de los bovinos fueron positivos a la 2^o semana PI. Conclusión: 1) Todos los animales inoculados, aún con mínimo volumen de sangre (5 µl) y por cualquiera de las vías, dieron positivo a las técnicas aplicadas. 2) Las pruebas ID y ELISA-I son de especial utilidad en estudios poblacionales, con mayor sensibilidad esta última. 3) Las técnicas de WB y PCR se consideran alternativas para los casos en que se requiera confirmación.

Palabras clave: Leucosis Bovina, ID, ELISA-I, WB, PCR.

ENZOOTIC BOVINE LEUKOSIS: EVALUATION OF DIAGNOSTIC TECHNIQUES (AGID, I-ELISA, WB AND PCR) IN EXPERIMENTALLY INOCULATED BOVINES

ABSTRACT Two experiments were designed using a total of twelve two years old bovinos (8 inoculated and 4 controls). The transmission of infection with Bovine Leukosis Virus (BLV) was made with blood of seropositive, asymptomatic bovinos (5, 10 and 50 µl) using different ways (ID, SC, IM and EV). All animals were weekly monitored during four month and analyzed comparatively applying the diagnostic methods developed in our laboratory. Indirect ELISA (I-ELISA) : Antibodies at levels higher than cut off point was found between the 3rd and 6th postinoculation (PI) week. Immunodiffusion in agar (ID): All inoculated animals resulted positive between the 4th and 6th PI week. 40 % of the animals kept weak positives until the 6th week. Western Blot (WB): The positive serums showed reactivity against the gp51 and the p24. No other proteins (gp30, p15, p12 and p10) were detected in any case. In 90 % of inoculated bovinos, the antibodies against the p24 were detected before (2nd- 4th PI week) than the antibodies against the gp51. PCR: a Nested-PCR was developed with primers for a stored segment of the env gen. In 75 % of bovinos provirus were detected 2 weeks PI. From the results of our study we can conclude that: 1) All inoculated animals (through any of the considered ways) made it positive in response to our techniques even those with the minimum blood volume (5 µl). 2) ID and I-ELISA tests are very useful in population studies, being the latter more sensitive. 3) The WB and PCR techniques are alternatives tests for cases requiring confirmation.

Key words: Bovine Leukosis, AGID, I-ELISA, WB, PCR

Fecha de recepción: 21/02/01

Fecha de aprobación: 24/10/01

Dirección para correspondencia: E.T. González. Cátedra de Virología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata CC 296 (B1900AVW) La Plata. Argentina

E-mail: etgonzal@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

El virus de la Leucosis Bovina (VLB) es un virus linfotrópico presente en las poblaciones bovinas de muchos países. La infección generalmente cursa en forma crónica y asintomática y puede dar linfocitosis persistente (LP) en un 30 % de los animales portadores del virus. La entidad clínica se denomina Leucosis Enzoótica Bovina (LEB) y está referida a animales serológicamente positivos. Luego de un prolongado período, en general de 3 a 5 años, solo una baja proporción de animales desarrollan tumor (0,1 – 5 %) (1, 2, 3).

La infección se transmite fundamentalmente en forma horizontal, vía iatrogénica, por exposición de los bovinos susceptibles a los linfocitos "B" portadores del virus (1, 4, 5). La sangre y la leche son los principales vehículos para la transmisión y la vía transplacentaria puede ser responsable de aproximadamente el 5 % de terneros infectados nacidos de madres portadoras.

La prevalencia aumenta a partir de los 6 meses de edad, con la mayor incidencia entre los 2 y 3 años (1), siendo mayor en planteles de bovinos de leche que en bovinos de carne (5, 6).

La infección ocurre frecuentemente a partir de la introducción de animales infectados asintomáticos al plantel y luego toma características enzoóticas.

Las proteínas estructurales de VLB como p24 y gp51 son importantes inmunógenos y los anticuerpos contra ellas pueden ser detectados en la mayoría de los animales infectados. Las proteínas codificadas por el gen *gag*, forman la estructura del virión y juegan un rol importante en las etapas iniciales del ciclo de la infección. Son designadas por su peso molecular como p24, p15, p12 y p10. De ellas, p24 es el mayor componente de la cápside y tiene varios sitios antigénicos.

Las proteínas de la envoltura, codificadas por el gen *env*, son reconocidas por el receptor celular y son responsables del tropismo, interferencia viral y fusión celular. Derivan de un precursor común que es modificado por glicosilación y clivaje proteolítico, produciendo dos proteínas asociadas: gp51 de superficie y gp30 de transmembrana (7, 8). La gp51 es un potente antígeno, responsable de la principal respuesta humoral del huésped. Los anticuerpos anti gp51 se detectan generalmente con títulos más altos que aquellos dirigidos contra la proteína p24.

En los estudios de infección con VLB se han empleado numerosos métodos diagnósticos tales como: Seroneutralización (SN), Radioinmunoensayo (RIA), Inmunodifusión (ID), *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), *Western Blot* (WB) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20).

En varios países existen programas oficiales para el control y erradicación de la LEB. El diagnóstico se realiza rutinariamente por métodos serológicos. La ID ha sido por muchos años la prueba de elección por su alta especificidad y aceptable sensibilidad. Recientemente se desarrollaron distintos equipos comerciales de ELISA para ser utilizados en muestras de suero y/o leche (10, 21, 22, 23).

PCR es una prueba conveniente para detectar DNA proviral en muestras de sangre, suspensiones de órganos y material tumoral, siendo un método sensible que permite un diagnóstico rápido y temprano (9, 15, 21).

Los objetivos de este trabajo fueron: 1) comprobar la transmisión del virus de LEB por distintas vías, empleando pequeños volúmenes de sangre total de animales serológicamente positivos y 2) demostrar la sensibilidad comparativa de las técnicas diagnósticas desarrolladas en este laboratorio

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES:

Lote A - Bovino donante naturalmente infectado con VLB (seropositivo por ID y ELISA-I. Positivo por PCR (12), asintomático, raza Holando Argentino, 5 años de edad, LP negativo).

Lote B - Doce bovinos de dos años de edad, Aberdeen Angus, provenientes de planteles seronegativos (tres determinaciones por ID y ELISA-I, con tres meses de intervalo. PCR negativos).

EXPERIENCIA I: Gráfico I (Período julio-noviembre). Se inocularon cuatro bovinos del lote B con 10 µl de sangre total del bovino dador lote A por vía intramuscular (IM), endovenosa (EV), subcutánea (SC) e intradérmica (ID), dejando como controles dos bovinos inoculados con solución fisiológica (SF).

Todos los animales fueron sangrados semanalmente separando los sueros para análisis serológicos (ID, ELISA-I, WB) y sangre con heparina para estudios hematológicos.

EXPERIENCIA II: Gráfico II (Período diciembre-marzo). A partir de dos animales seropositivos de la experiencia I (06/203 y 08/7173) se inocularon cuatro bovinos del lote B, todos por vía SC. Dos de ellos con 5 µl y dos con 50 µl de sangre total. Como controles se inocularon dos bovinos con SF.

Todos los animales fueron sangrados semanalmente separando los sueros para análisis serológicos (ID, ELISA-I, WB) y sangre con heparina para estudios hematológicos y PCR.

En ambas experiencias los animales controles convivieron con los inoculados, aplicando un antiparasitario externo (Cipermetrina) a todos los animales, para prevenir la posible transmisión horizontal de la enfermedad por insectos hematófagos.

PRUEBAS DIAGNÓSTICAS:

Inmunodifusión (ID): todas las muestras de suero fueron analizadas empleando el equipo comercial producido en la Cátedra de Virología Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, aprobado por SENASA, Servicio Nacional de Sanidad Animal (Exp. 41.285/87). El equipo detecta suero positivo de referencia E4 diluido 1/10 en suero negativo (Council Directive 64, EEC, July 1989, Annex G0).

ELISA-indirecto (ELISA-I): la técnica fue realizada según se detalla en el instructivo del equipo de diagnóstico de un ELISA-indirecto desarrollado en este Laboratorio de Virología (LeucoKit-La Plata). Básicamente el procedimiento fue el siguiente: en placas de poliestireno (Nunc-Immunoplate) se colocaron 100 µl en cada pocillo de la dilución de antígeno previamente establecida. Luego de la incubación y respectivos lavados, se sembraron por duplicado diluciones 1:24 de los sueros controles positivo y negativo y de las muestras problema en un volumen total de 100 µl por pocillo. Luego de lavar 3 veces, se agregó 50 µl por pocillo de anti-inmuno globulina bovina marcada con peroxidasa, incubando 1 hora a 37 °C. Luego de lavar, se colocó 100 µl de la solución de sustrato (ABTS) a cada pocillo, incubando y realizando finalmente la lectura en espectrofotómetro con filtro 405 nm. El valor de corte (media de los sueros negativos + 2 desvíos estándar) fue establecido con 100 sueros provenientes de tres planteles de bovinos sin antecedentes de la enfermedad y seronegativos en tres pruebas consecutivas con intervalos de tres meses cada vez.

Los resultados fueron expresados ($X_s - X_n$) / ($X_p - X_n$) , donde:

X_s = Promedio de las dos lecturas del suero problema

X_n = Promedio de las dos lecturas del suero control negativo

X_p = Promedio de las dos lecturas del suero control positivo.

Western Blot (WB): se utilizó un antígeno parcialmente purificado obtenido de una línea celular (FLK) infectada persistentemente con VLB. El antígeno se diluyó 1:2 en buffer de muestra en condiciones no reducidas y se corrió en geles de poliacrilamida al 12 %, a 100V. Las proteínas virales fueron luego transferidas a papeles de nitrocelulosa (Bio-Rad 0,45 µm). Se bloqueó con gelatina al 3 % y luego de lavar apropiadamente, se incubó con los sueros problemas y testigos diluidos 1/100. Después de lavar se incubó con el suero antibovino marcado con peroxidasa diluido 1/500. El revelado de la reacción se realizó con 3,3 diaminobencidina y peróxido de hidrógeno (13).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): se aplicó una Nested PCR siguiendo la técnica detallada oportunamente (12). Los cebadores sintetizados para un segmento del gen *env* son los siguientes:

Primers externos:

OVLB -1 5'- GTGCCAAGTCTCCCAGATACA-3'

OVLB -6 5'- TATAGCACAGTCTGGGAAGGC-3'

Primers internos:

OVLB- 3 5'- CTGTAAATGGCTATCCTAAGATCTACTGG 3

OVLB- 5 5'- GACAGAGGGAACCCAGTCACTGTTCAACTG-3'

Para cada muestra de sangre se separaron los linfocitos utilizando Ficoll-Hypaque (resuspendidos en PBS a una concentración de 10^4 cel/50 µl) tratados luego a 100 °C por 12 min y conservados a -20 °C hasta su uso.

Las dos amplificaciones se realizaron en un volumen total de 50 µl, en 30 ciclos cada una (1 min a 94 °C, 1 min a 60 °C). Los productos finales fueron corridos en un gel de agarosa al 2 % y teñidos con Bromuro de Etidio. Utilizando UV las muestras positivas fueron caracterizadas por la aparición de una banda correspondiente a 360 pares de bases. Para corroborar la especificidad de la prueba los productos de la segunda amplificación se sometieron a un corte con enzima BamHI y luego se corrieron en geles de poliacrilamida al 6 % (12).

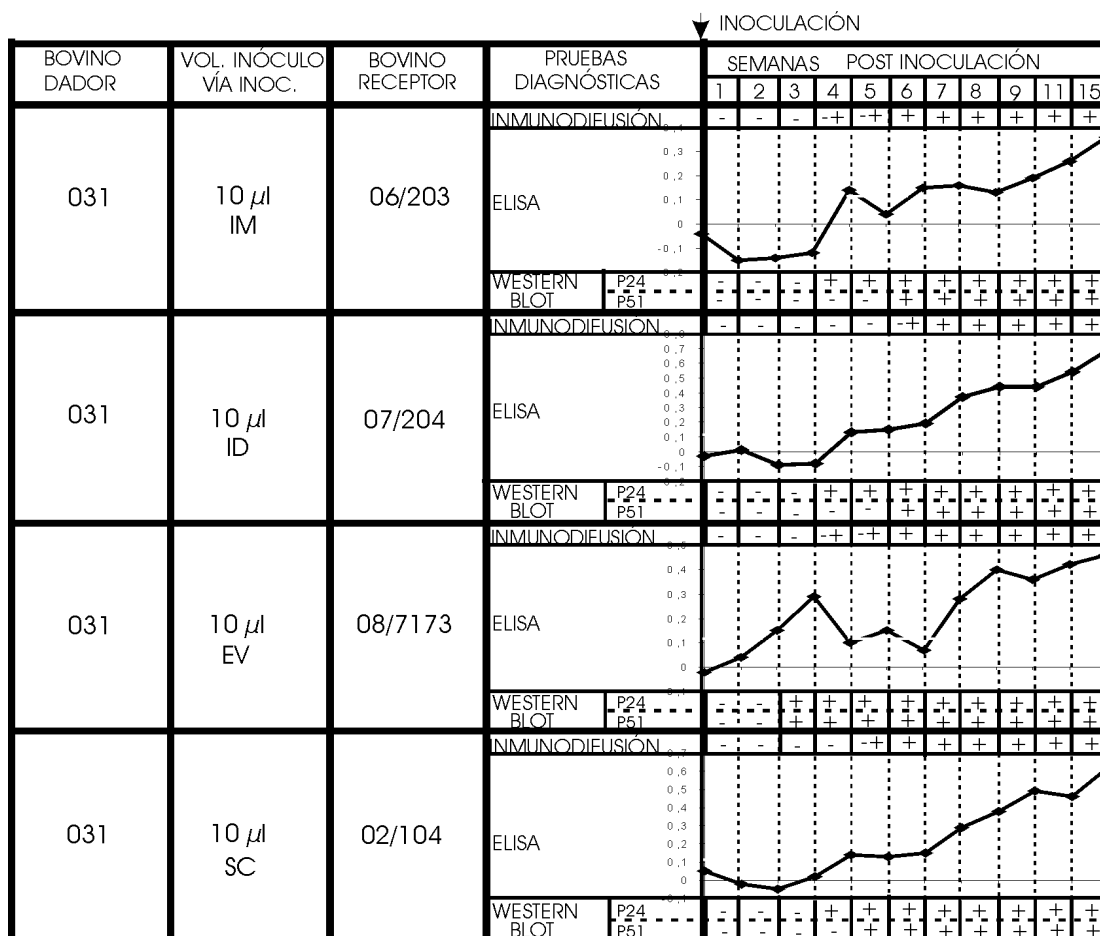
RESULTADOS

En todos los casos se demostró transmisión de la enfermedad con pequeños volúmenes: 5, 10 y 50 μ l de sangre periférica, independiente de la vía considerada (subcutánea, endovenosa, intradérmica e intramuscular).

Ninguno de los bovinos que participó en las dos experiencias presentó linfocitosis durante las doce semanas que duró cada una.

EXPERIENCIA I (Gráfico I)

ID: tres animales fueron débilmente positivos



Bovino 031: naturalmente infectado

BOVINOS CONTROLES *

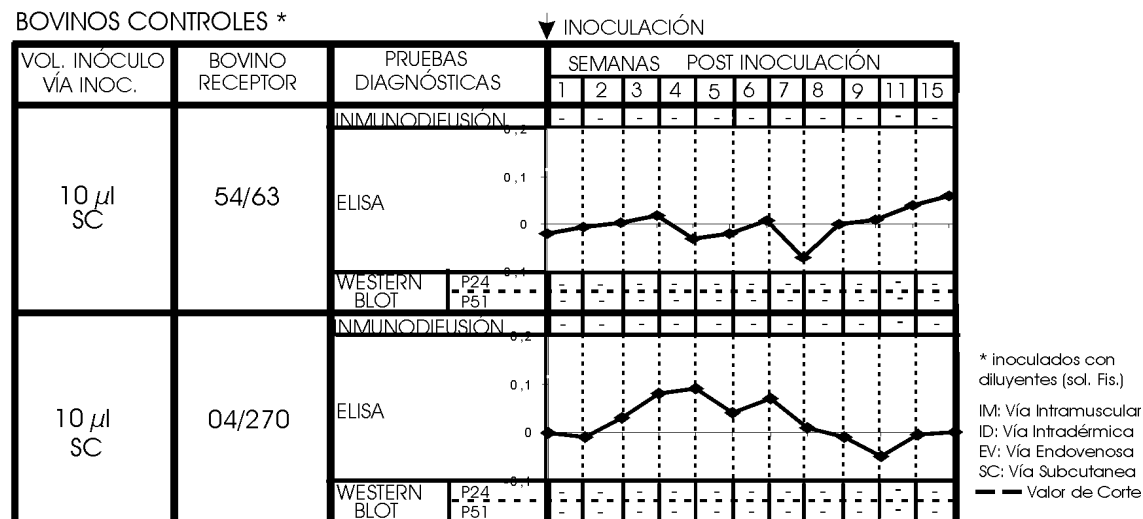


Gráfico I. Experiencia I: Evolución de la respuesta de anticuerpos en 4 bovinos infectados experimentalmente y 2 controles, aplicando las pruebas ID, ELISA-i y Western Blot.

Graphic I. Experience I: Evolution of antibodies response in four bovinos experimentally infected and two controls applying ID, ELISA-i and Western Blot techniques.

vos entre la 4^o y 5^o semana (06/203, 08/7173 y el 02/104) mostrando reactividad franca a partir de la 6^o semana PI, el cuarto bovino (07/204) fue débil positivo a la 6^o semana, demostrándose como franco positivo a partir de la 7^o semana PI.

ELISA-I: uno de los animales (08/7173) fue positivo a partir de la 2^o semana, con posteriores fluctuaciones en el título y elevación franca a partir de la 7^a semana PI. Otro ternero (06/203) fue positivo a la 4^o semana, con elevación del título de anticuerpos a partir de la 6^o semana. Los restantes bovinos (07/204 y 02/104) reaccionaron positivamente en las muestras tomadas a partir de la 4^o semana.

WB: se determinaron anticuerpos contra las dos principales proteínas, p24 y gp51, apareciendo más tempranamente los correspondientes a la primera de ellas. En uno de los animales (08/7173) los anticuerpos contra p24 se detectaron a la 3^o semana y en el resto de los animales a la 4^o semana PI. Para la gp51 uno de los animales (08/7173) fue positivo a la 3^o semana PI, otros dos (06/203 y 02/104) a la 5^o semana y el 4^o bovino (07/204), a la 6^o semana PI (Figura 1).

Los controles se mantuvieron negativos por la totalidad de las técnicas (ID, ELISA-I, WB), a lo largo la experiencia.

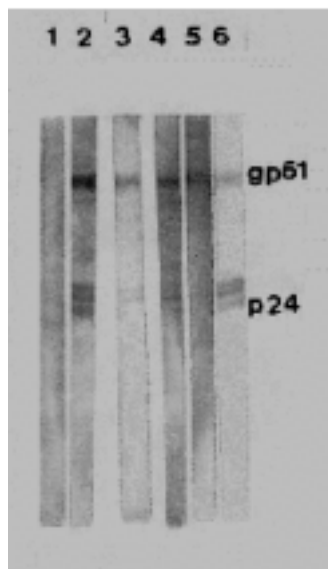


Figura 1. Western Blot. 1: control negativo, 2: control positivo, 3-6: sueros positivos con distinto grado de reactividad para la gp51 y p24.

Figure 1. Western Blot. 1: negative control, 2: positive control, 3-6: positive serum with different reactivity against gp51 and p24.

EXPERIENCIA II (Gráfico II)

ID: en tres animales se comenzó a detectar seroconversión a la 4^o semana PI (57/40, 36/34, 54/64). Uno de ellos (36-34) se mantuvo débil positivo durante toda la experiencia. Otro de los animales (72/72) seroconvirtió a la 6^o semana como débil positivo siendo franco a partir de la 7^o semana PI.

ELISA I: los cuatro animales seroconvirtieron entre la 4^o y 5^o semana PI.

WB: al igual que en la experiencia I, se observó la aparición de anticuerpos contra la p24 antes que para la gp51. En dos animales (72/72 y 54/64) los anticuerpos contra la p24 se detectaron a la 3^o y a la 4^o semana para los dos restantes (57/40 y 36/34).

Los anticuerpos contra la gp51 se detectaron en un animal (54/64) a la 4^o semana, en otro (72/72) a la 5^o semana y en los restantes (57/40 y 36/34), a la 6^o semana PI.

PCR: (Figura 2) a partir de la 2^o semana PI tres de los cuatro animales (57/40, 36/34, 54/64) dieron resultado positivo correspondiente a una banda de 360 pb y el restante (72/72) a partir de la 3^o semana PI. En todos los casos el producto de la digestión con Bam-HI dio como resultado 2 fragmentos de DNA correspondientes a 198 y 162 pares de bases (Figura 3).

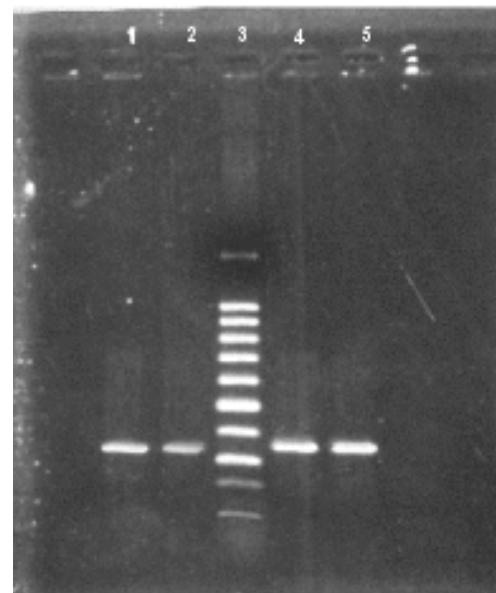
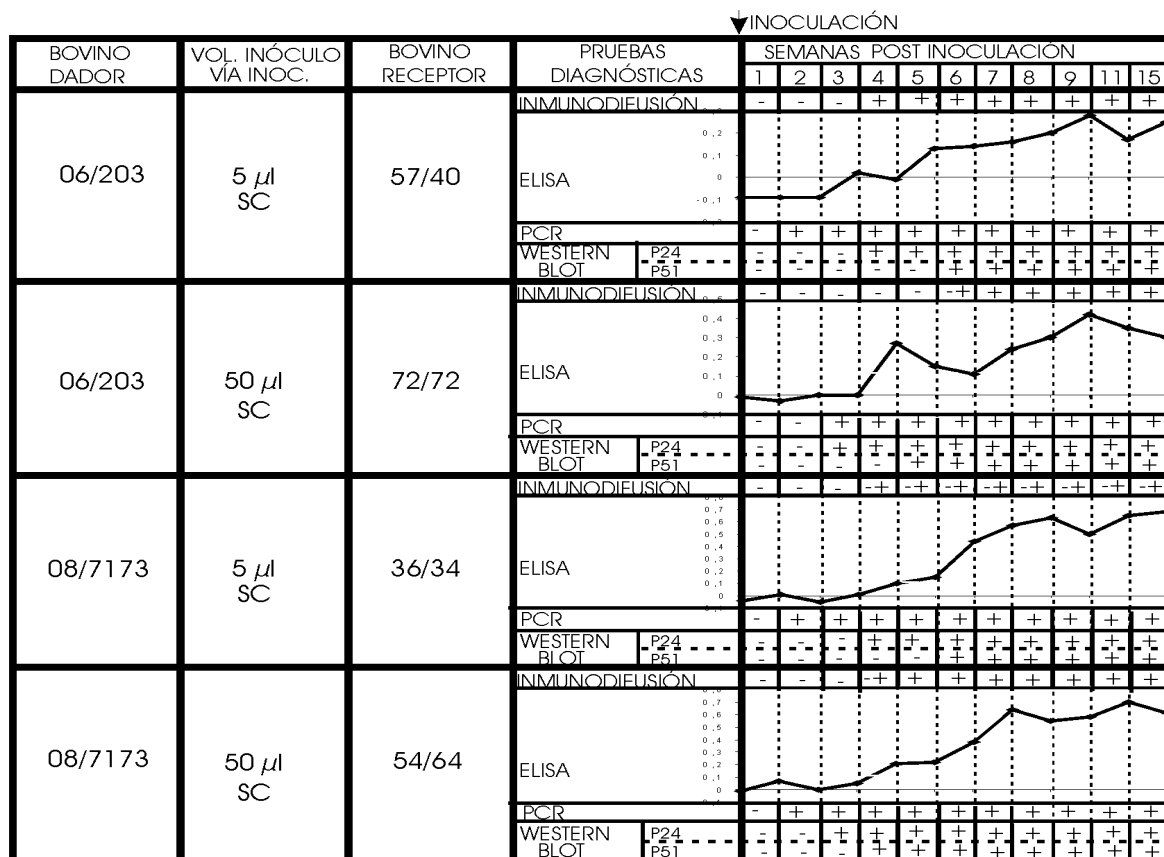


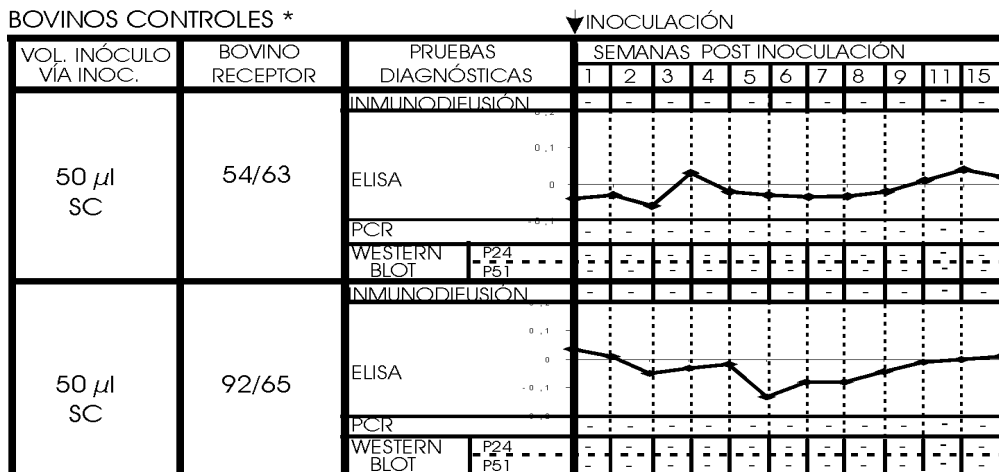
Figura 2. PCR . 1, 2, 4, 5: amplificación del segmento de 360 pb correspondiente a las muestras de la experiencia II. 3: marcador de peso molecular.

Figure 2. PCR. 1, 2, 4, 5: amplification of 360 bp segment corresponding to experience II samples. 3: MW marker.



Bovinos 06/203 y 08/7173: animales infectados en la experiencia I

BOVINOS CONTROLES *



* inoculados con diluyentes (sol. Fis.)

SC: Vía Subcutánea

— Valor de Corte

Gráfico II. Experiencia II: Evolución de la respuesta de anticuerpos y detección de provirus en 4 bovinos experimentalmente inoculados y 2 controles, aplicando las pruebas de ID, ELISA-i, Western Blot y PCR.

Graphic II. Experiencia II: Evolution of antibodies response and provirus detection in four bovines experimentally infected and two controls applying ID, ELISA-i, Western Blot and PCR.

Los controles se mantuvieron negativos durante toda la experiencia por las cuatro técnicas aplicadas (ID, ELISA-I, WB y PCR).

DISCUSIÓN

A diferencia de Johnsson y col. y Klintevall y col. (16,20), quienes sostienen que la infección con BLV depende de la dosis y la ruta de infec-

ción, en ambas experiencias (I y II) se observó que todos los animales resultaron infectados por distintas vías y con volúmenes pequeños como 5 µl de sangre periférica de animales seropositivos y sin linfocitosis. Se debe señalar que en la experiencia II se utilizaron como dadores animales recientemente infectados (4 meses) provenientes de la experiencia I y todos los bovinos receptores re-

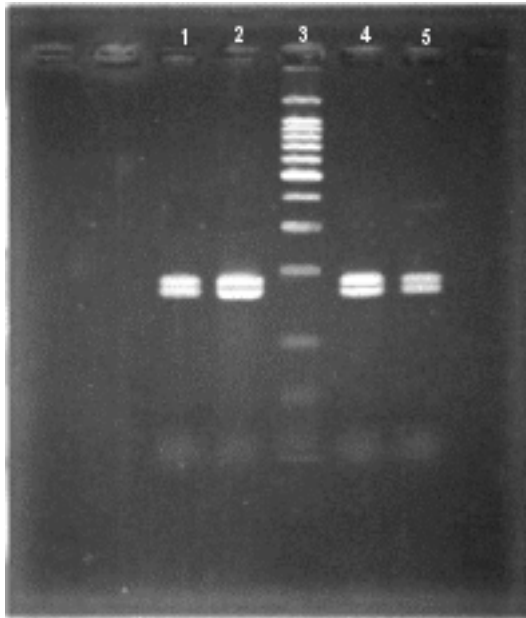


Figura 3. 1, 2, 4, 5: resultados de la digestión enzimática con *Bam HI* de los productos de PCR de muestras de la experiencia II. 3: marcador de peso molecular.

Figure 3. 1, 2, 3, 5: results of enzymatic digestion with *Bam HI* of PCR experience II products. 3: MW marker.

sultaron susceptibles a la infección detectándose anticuerpos (ID, ELISA-I, WB) y virus (PCR). La cantidad de linfocitos utilizados para realizar la transmisión horizontal fue al menos de 3×10^4 linfocitos (5 μ l de sangre). Esto se contradice con lo señalado por Naif y col. (4) quien informa no haber detectado anticuerpos anti VLB en animales infectados con 10^7 linfocitos de un animal persistentemente infectado.

La prueba de ID es específica y práctica para detectar anticuerpos en muestras individuales de suero y ha demostrado sensibilidad comparable a lo informado por otros autores para esta técnica (2, 4, 5).

El ELISA-I aplicado en las muestras obtenidas semanalmente, demostró ser un método sensible, rápido y de resultados objetivos, que podrá ser útil a la hora de hacer análisis de un gran número de muestras.

Comparando nuestros resultados de ID y ELISA-I, se observa buena correlación entre ambas técnicas y pueden ser usadas en forma complementaria en planes de control y erradicación.

Las proteínas identificadas por la técnica de WB corresponden a los genes *env* y *gag* (3, 16,

18, 22, 25). Respecto al producto del gen *env*, es esperable la detección de 2 glicoproteínas, gp51 y gp30, componentes del envelope y relacionadas directamente con la infectividad viral (16, 18, 5). Los anticuerpos contra la p24 (codificada por el gen *gag*) se detectan en general más tempranamente que aquellos para la gp51, siendo la primera de ellas un importante antígeno y de valor diagnóstico en la prueba de WB. Según lo señalado por Kittelberger y col. (19), la reacción contra la proteína p24 puede ser muy clara por WB, mientras que la reacción contra gp51 puede ser débil o incluso estar ausente. Dicha ausencia de reactividad contra gp51 no debe ser considerada necesariamente como diagnóstico negativo de infección (2).

De acuerdo a nuestros resultados, la reactividad para la p24 fue en algunos animales más temprana que para la gp51 pero finalmente se detectaron anticuerpos para ambas proteínas en todos los animales inoculados. Los anticuerpos contra la gp30 no fueron detectados en ningún caso.

WB puede emplearse como prueba confirmatoria en una etapa tardía de un programa de erradicación, ya que es altamente específico y detecta anticuerpos contra las proteínas principales de VLB.

Según recomiendan Dinte y col. (7) cuando se comparan resultados por diferentes métodos serológicos, se debe incluir en las pruebas un suero estándar de referencia. Nosotros incorporamos en esta experiencia el suero de referencia internacional E4, que determina el límite menor de sensibilidad en ID o ELISA tanto para suero como para leche.

Respecto a la prueba de PCR aplicada a las muestras de los animales de la experiencia II, ha permitido detectar DNA proviral a partir de la segunda semana y en general en forma más temprana que las pruebas serológicas (con la excepción de un animal en la que se igualó a la reactividad observada para la p24 en la prueba de WB). La PCR no es práctica para ser aplicada en un elevado número de muestras, pero resulta apropiada para ciertos casos como el diagnóstico en terneros jóvenes que posean anticuerpos calostrales o en casos de un resultado no concluyente de otras pruebas serológicas.

PCR debe considerarse como un método de alta sensibilidad y confirmatorio en la detección de infección con VLB (9).

CONCLUSIONES

A) Se confirma la posibilidad de transmisión de la infección en forma horizontal a partir de pequeños volúmenes de sangre periférica de dador asintomático seropositivo; corroborando de esta forma la importancia de los recaudos en las medidas de manejo que se deben aplicar para impedir la vía iatrogénica de infección (cambio de agujas en vacunaciones, cambio de guantes para tacto, moqueta, etc.).

B) Todas las técnicas aplicadas (indirectas: ID, ELISA-I, WB y directa: PCR), fueron apropiadas para la detección de infección (variando en la sensibilidad).

C) La técnica de ID y ELISA-I son apropiadas para aplicar a nivel poblacional (planes de control y erradicación).

D) WB y PCR son pruebas alternativas para casos en que se requiera confirmación, siendo esta última la apropiada para detección directa del virus.

BIBLIOGRAFÍA

1. Di Giacomo RF. The epidemiology and control of bovine leukemia virus infection. *Vet Med.* 1992; 3: 248-257.
2. Domenech A, Llamas L, Goyache J, Suárez G, Gómez-Lucía E. Comparison of four tests to evaluate the reactivity of rabbit sera against envelope or Gag-related proteins of bovine leukemia virus (BLV). *Vet Microbiol.* 1998; 60: 13-25.
3. Grover YP, Guillemain B. An immunoblotting procedure for detection of antibodies against Bovine Leukemia Virus in cattle. *J Vet Med B.* 1992; 39: 48-52.
4. Naif H, Daniel RCW, Cogle WG, Lavin MF. Early detection of bovine leukaemia virus by using an enzyme-linked assay for polymerase chain reaction-amplified proviral DNA in experimentally infected cattle. *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 675-679.
5. Schwartz I, Levy D. Pathobiology of bovine leukemia virus. *Vet Res.* 1994; 25: 521-536.
6. Hoff- Jorgensen R. An international comparison of different laboratory tests for the diagnosis of bovine leukaemia: suggestions for international standardization. *Vet Immunol Immunopathol.* 1989; 22: 293-297.
7. Dinter Z. Enzootic bovine leukaemia, diagnostic virology. In: J. Moreno-Lopez (Ed). A review of methods at the National Veterinary Institute 1989: 115-122.
8. Klintevall K, Ballagi Pordány A, Näslund K, Belák S. Bovine Leukaemia Virus: Rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. *Vet Microbiol.* 1994; 42:191-204.
9. Ballagi-Pordány A, Klintevall K, Merza M, Klingeborn

B, Belák S. Direct Detection of Bovine Leukemia Virus Infection: Practical Applicability of a Double Polymerase Chain Reaction. *J Vet Med B* 1992; 39: 69-77.

10. Gallo R, Wong-Staal F. *Retrovirus Biology and Human Disease*, Ed. Dekker, New York (EEUU) 1990; p.130-155.

11. Rodak L, Granátová M, Veselý T, Nevoránková Z. Monoclonal Antibody for the demonstration by ELISA of antibodies to protein p24 of enzootic bovine leucosis virus in individual and pooled blood serum and milk samples. *J Vet Med B* 1997; 44: 425-436.

12. Gonzalez ET, Norimine J, Valera AR, Travería G, Oliva GA, Etcheverrigaray ME. A Rapid and sensitive diagnosis of bovine leukaemia virus infection using the nested shuttle polymerase chain reaction. *Rev Pesq Vet Bras.* 1999;19:63-67.

13. Gonzalez ET, Oliva GA, Norimine J, Cid de la Paz V., Echeverría MG, Etcheverrigaray ME. Enzootic Bovine Leukosis (ELB): evaluation of the Western Blot technique applied to the diagnostic. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 1999; 51 (4): 299-305.

14. Graves DC, McQuade M, Weibel K. Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay with an early polykaryocytosis inhibition assay and the agar-gel immunodiffusion test for the detection of antibodies to bovine leukemia virus. *Am J Vet Res* 1982; 43 (6): 960-966.

15. Heeney J, Valli VE, Montesani J. Alterations in humoral immune response to bovine leukemia virus antigens in cattle with lymphoma. *J Gen Virol.* 1998;69: 659-666.

16. Johnson R, Kaneene JB. Bovine leukemia virus. Part I: Descriptive epidemiology, clinical manifestations, and diagnostic tests. Continuing education article 12. *The Compendious, North American Edition. Food Animal.* 1991;13: 315-327.

17. Johnson R, Kaneene J. Bovine Leukemia Virus and Enzoitic Bovine Leukosis. *Vet. Bull.* 1992; 62: 287-312.

18. Kettmann R, Covez D, Burny A. Restriction endonuclease mapping of linear unintegrated proviral DNA of Bovine Leukemia Virus. *J Virol.* 38: 27-33

19. Kittelberger R, Reichel MP, Meynell RM, Tham K, Molloy JB. Detection of antibodies against the core protein p24 of the bovine leukaemia virus in cattle for confirmatory serological testing. *J of Virological Methods* 1999; 77: 109-114.

20. Klintevall K, Fuxler L, Fossum C. Bovine Leukemia Virus: early reflections in blood after an experimental infection of calves. *Comp Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 1997; 20 (2): 119-130.

21. Kono YW, Irishio H Sentsui. Syncytium-induction Inhibition Test with Complement for Detection of Antibodies Against Bovine Leukemia Virus. *Can J Comp Med* 1983; 47: 328-331.

22. Mamoun RZ, Morisson M, Rebeyrotte N, Busetta B, Covez D, Kettmann R, Hospital M, Guillemain G.

Sequence variability of bovine leukemia virus env gene and its relevance to the structure and antigenicity of the glycoproteins. *J Virol.* 1990; 64: 4180-4190.

23. Reichel MP, Tham KM, Barnes S, Kittelberger R. "Evaluation of alternative methods for the detection of bovine leukaemia virus in cattle" *N Z Vet J* 1998; 46: 140-146.

24. Takahashi K, Kono Y. Development of Practical ELISA for Detection of Antibodies to Bovine Leukemia Virus: A Comparison of its Sensitivity with that of virus Neutralization and Agar Gel Immunodiffusion Tests. *Jpn J Vet Sci.* 1985; 47(2): 193-200.

25. Uckert W, Hertling I, Kraft R, Bossomann H, Rösler H, Meyer U. Structural components of bovine leukemia virus: further biochemical and immunological characterization of major structural proteins and glycoproteins. *Virus Res.* 1986; 4: 343-356.